

【総説】

遺伝子発現からみた肝疾患

Transcriptome analysis of liver diseases

金沢大学大学院医学研究科感染症病態学助教授

本 多 政 夫

はじめに

本邦における肝細胞癌死亡数は年間およそ3万5千人を越え、増加傾向を示している。我が国の肝細胞癌はウイルス性肝炎を主因とする肝硬変から発生することが大半である。したがって発癌メカニズムの解明と発癌抑制には肝細胞癌そのものの遺伝子解析に加え、その発生母地である肝炎組織における遺伝子解析も重要である。さらには、肝細胞癌に至る前癌病変の遺伝子解析も極めて重要と考えられる。私たちは、遺伝子発現と肝病態との関係を明らかにし、肝疾患治療の新たなストラテジーの構築に役立てることを目的として、SAGE法やcDNAマイクロアレイ法を用いた正常肝、慢性肝炎、肝細胞癌の網羅的遺伝子

発現解析を行っている.

1. cDNA マイクロアレイ法を用いたウイルスゲノムの検出

私たちが使用している cDNA マイクロアレイの感度を評価する目的で、B 型慢性肝炎症例の血清中の HBV-DNA がどれだけの感度で検出できるかを検討した。患者血清より DNA を抽出しラベリング後、スライド上にスポットした HBV ゲノムにハイブリダイゼーションした (図 1)。患者血清 1. 2×10^5 Eq/ml の HBV-DNA を検出することが可能であった。またプラスミド DNA を用いた場合、 10^4 copy/ml の検出感度であり、これは 0.02 pg のプラスミド DNA に相当する。また、プローブ法を用いた bDNA 法と比較しても強い相関が認められた (図 2) ¹⁾。

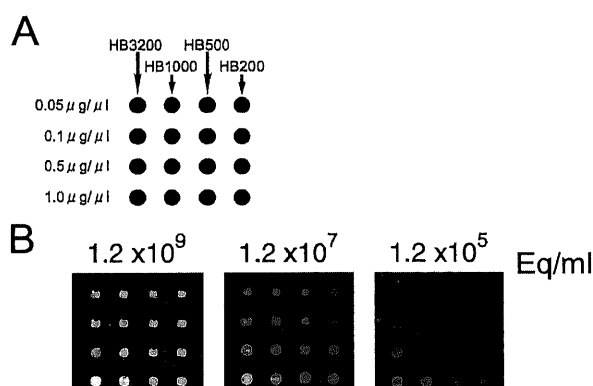


図1. cDNAマイクロアレイを用いたHBV-DNAの検出

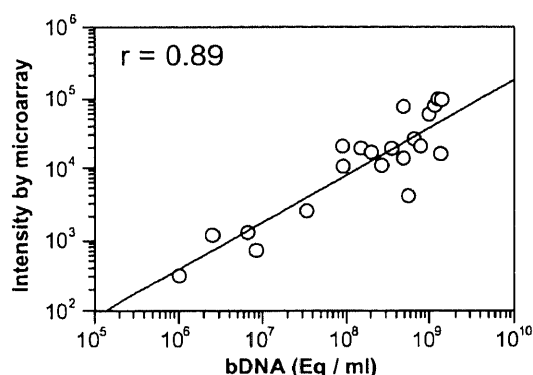


図2. cDNAマイクロアレイ法とbDNA法の比較

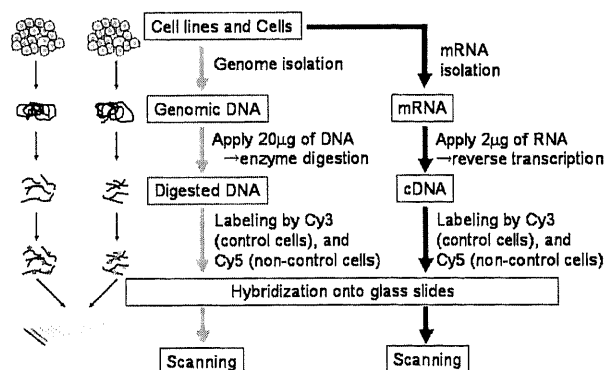


図3. マイクロアレイCGH

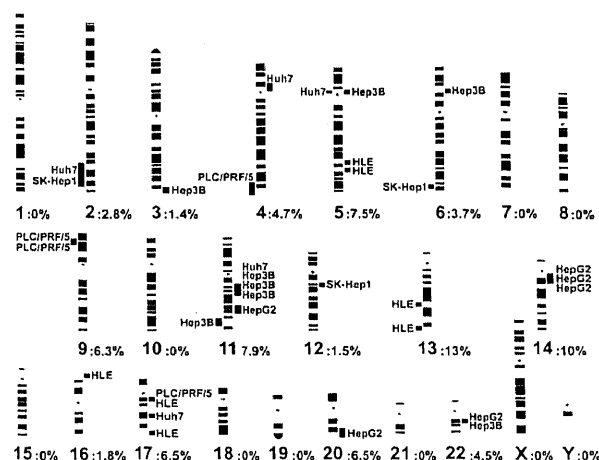


図4. 肝細胞癌培養細胞株のゲノム増幅と減弱
右：増幅、左：減弱

肝炎，C型肝細胞癌組織では，MHCclassIの発現やsuperoxide dismutase 2などの発現が認められている(表2)⁷⁾。これまでに正常肝，B型慢性肝炎，C型肝炎慢性，B型肝炎細胞癌，C型肝炎細胞癌よりSEGEライブラリーを作成し，計516,862tag シークエンスを有する世界最大規模の肝臓SEGEライブラリーを作成している(表3)。癌組織ではアノテーションされていないESTや alternative spliced form また pseudo gene 等の発現が認めれる⁸⁾。肝細胞癌で発現亢進する新規遺伝子の役割を明らかにすることによって発癌の分子機序が明らかになるものと考えられる。

2)cDNA マイクロアレイ法を用いた慢性肝炎，肝細胞癌例の解析

SAGE法による解析は，症例数が限られるため，疾患特異的遺伝子発現パターンの同定には多数例を用いた解析が必要であ

表1. 正常肝における遺伝子発現

Gene	Count	Percent
Albumin	1,088	3.4774
Apolipoprotein A-I	876	2.7998
Apolipoprotein C-I	772	2.4674
Apolipoprotein C-III	669	2.1382
ATPase 6/8 (mitochondrial)	468	1.4958
Cytochrome oxidase 3 (mitochondrial)	347	1.109
Cytochrome oxidase 2 (mitochondrial)	346	1.1058
Alpha-1 antitrypsin	326	1.0419
Cytochrome oxidase 1 (mitochondrial)	294	0.9396
Apolipoprotein E	294	0.9396
NADH dehydrogenase 4 (mitochondrial)	292	0.9332
Vitronectin	291	0.93
Orosomucoid-1	291	0.93
Plasma retinol binding protein	274	0.8757
Apolipoprotein A-II	269	0.8597

表2. 慢性肝炎，肝細胞癌で発現亢進する遺伝子

Gene	NL	CH-C	HCC (count)
MHC, class I C	0	67	76
MHC, class I B	1	14	41
transmembrane protein BR1	0	3	19
superoxide dismutase 2	0	7	15
glypican 3	1	0	15
DEAD/H box polypeptide 5	1	10	15
transcription elongation factor B	1	3	15
EST	1	1	14
IFN-gamma inducible protein of 10 kDa	0	0	13
diubiquitin	0	0	12

表3. SAGEライブラリー

Normal liver	30,982 tags	8,596 unique tags
Chronic hepatitis C	30,543 tags	10,284 unique tags
Hepatocellular carcinoma C	31,381 tags	10,174 unique tags
Chronic hepatitis B	32,726 tags	11,178 unique tags
Hepatocellular carcinoma B	32,217 tags	13,372 unique tags
Normal liver pooled	97,150 tags	27,622 unique tags
Chronic hepatitis C pooled	69,322 tags	18,564 unique tags
Hepatocellular carcinoma C pooled	59,795 tags	16,689 unique tags
Chronic hepatitis B pooled	70,824 tags	19,413 unique tags
Hepatocellular carcinoma B pooled	47,009 tags	20,532 unique tags
Total	516,862 tags	82,575 unique tags

る。私たちはcDNA マイクロアレイ法を用いて多数症例の慢性肝炎，肝細胞癌組織における遺伝子発現解析を行っている。正常肝6例，B型慢性肝炎例12例，C型慢性肝炎例14例の生検肝組織を用いて慢性肝炎における遺伝子発現異常を解析した。クラスター解析の結果，興味深いことに，B型肝炎例とC型肝炎例は大きく群別され，両肝炎は遺伝子発現パターンによって

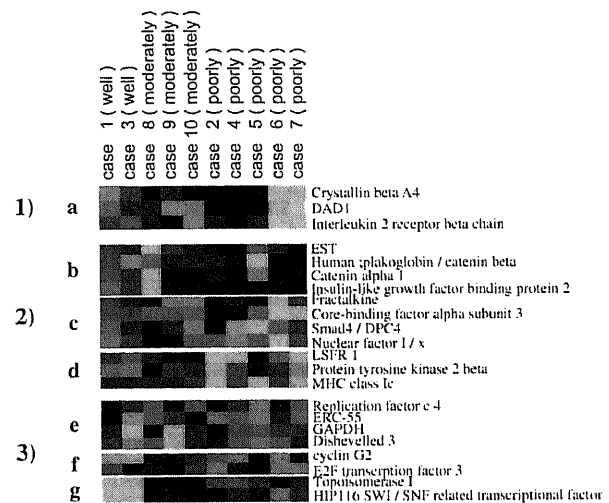


図7. 肝細胞癌組織分化度と遺伝子発現

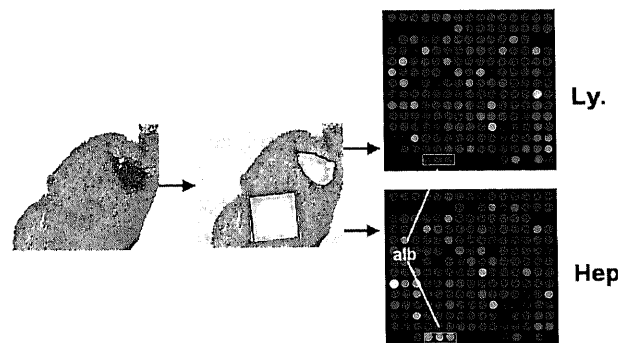
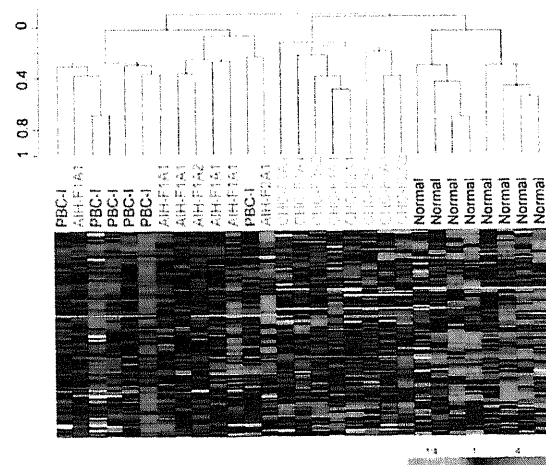


図8. LCMサンプルを用いたハイブリダイゼーション例



大きく分けられることが明らかとなった(図6)⁹⁾。また、10例の肝細胞癌手術例における検討を行い、癌部の遺伝子発現異常について検討した。10例中5例以上の症例で2倍以上の変動を示した遺伝子を示した(表4)。10症例のクラスター解析では、症例を組織分化度に分けて、分化度に応じて群別される遺伝子を検討した(図6)。高分化型肝細胞癌で発現亢進する遺伝子(3

個)、高分化から中分化肝細胞癌で発現亢進する遺伝子(11個)、低分化型肝細胞癌で発現亢進する遺伝子(8個)が同定された。これらのうち13遺伝子は分化、増殖に働く転写因子であった(図7)¹⁰⁾。

3) Laser capture micro-dissection 法を用いた超微量サンプルの解析

表4. 癌部で非癌部に比し発現異常が認められる遺伝子

gene name	number of cases C ₂ S/C ₃ 3 > 2.0	average of C ₂ S/C ₃ 3
Human DNA sequence from clone 27(M21 on chromosome 6p21.31-22.2	8	2.80
cytoplasmic dynein light chain (hdc 1)	7	3.47
Hepatoma-derived growth factor	6	3.47
Ribosomal protein L6	6	5.59
Human glutathione S-transferase	6	3.70
Fibronectin gene	5	2.54
Ras homolog gene family, member B	5	2.53
TR3 orphan receptor	5	2.93
c-myc transcription factor (puf)	5	4.58
Major histocompatibility complex, class I, C	5	2.57
gene name	number of cases C ₂ S/C ₃ 3 < 0.5	average of C ₂ S/C ₃ 3
Plasminogen	9	0.24
Corticotropin releasing hormone-binding protein	8	0.37
GRO2 oncogene	8	0.34
Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10)	7	0.37
Alpha platelet-derived growth factor receptor precursor	6	0.34
Cell division cycle 25C	5	0.46
Cytochrome P450, subfamily 11C	5	0.25
Human intercrine-alpha (hIRH)	5	0.27
Interleukin 8	5	0.44

表5. 自己免疫性肝疾患解析症例

正常例	9例
PBC(Stage I)	6例
PBC(Stage ≥ II)	10例
AIH	7例
Chronic hepatitis C (CHC)	8例

表6. Stage 1 PBC の CNSDC 病変で発現上昇する遺伝子

<u>•Cytokine</u>	PBC stage I/CHC
•Interferon, gamma	•10.9
•Interleukin 7	•2.9
•Interleukin 6 receptor	•2.7
•Interleukin 11	•2.6
<u>•Cell proliferation related</u>	
•eIF 4A, isoform 1	•8.0
•MAP kinase kinase 3	•5.2
•Autocrine motility factor receptor (AMFR)	•2.6
<u>•Transcription</u>	
•c-myc binding protein	•3.3
•NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	•3.3
<u>•Immune modulator</u>	
•Rapamycin associated protein (mTOR)	•2.9
•FK506-binding protein 4 (59kD)	•2.6
•MHC class II DR	•3.7

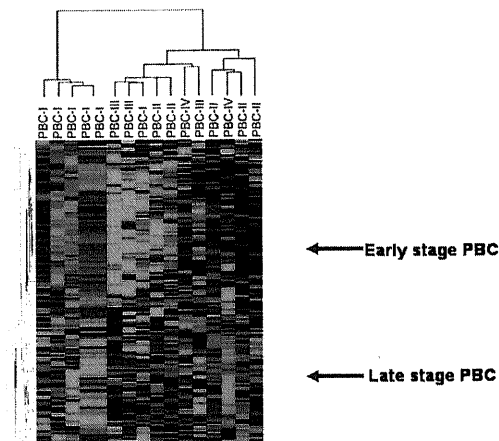


図10. 初期PBCと病期進行に伴い発現誘導減弱する遺伝子

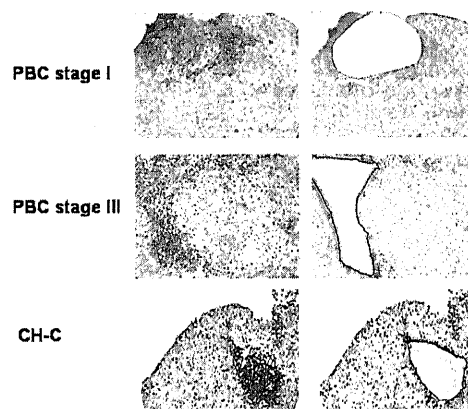
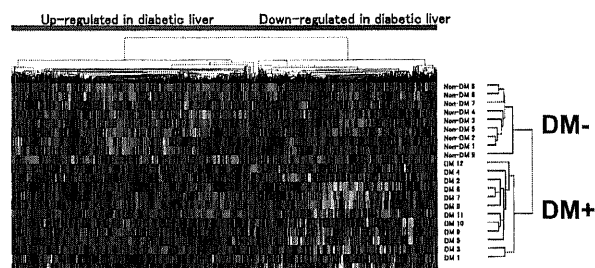


図11. LCMによるCNSDC病変の遺伝子発現解析



Up-regulation of angiogenic factors such as VEGF, endothelin, PDGF etc.

図12. 糖尿病症例及び非糖尿病症例の肝臓における遺伝子発現の違い

文 献

手術及び生検サンプルから得られる肝組織には肝細胞以外に、伊東細胞、血管内皮、クッパー細胞など肝細胞以外の細胞が含まれている。特に肝炎に於いては免疫担当細胞の浸潤が顕著に認められるため、全肝組織を用いた解析は必ずしも肝細胞における遺伝子発現変化を反映していない可能性がある。Laser capture micro-dissection (LCM)法を用いることにより、特徴的な組織変化を示す部位の遺伝子発現解析が可能である。私たちの検討では生検組織より LCM により肝小葉細胞、門脈域浸潤細胞を分けて採取しそれぞれの遺伝子解析を行うことが可能であった (図8)。現在解析を進めている。このように LCM を用いた超微量サンプルの解析も臨床上極めて有用である¹⁰⁾。

4) ウイルス性肝炎以外の肝疾患解析

ウイルス性肝疾患の遺伝子発現解析に加え、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) の遺伝子発現解析を行っている (表5)。正常肝 (normal)、C 型慢性肝炎 (CH-C)、AIH、PBC はそれぞれ疾患ごとにクラスターされ、各肝疾患における遺伝子発現の違いが明らかとなった (図9)。興味深いことに PBC で特徴的に発現している遺伝子は PBC 初期病変で強く発現しており、病期の進行と共にむしろ減少していくことが明らかとなった (図10)。このような遺伝子発現変化が胆管病変の遺伝子発現変化に伴うかどうかを明らかにするため LCM にて CNSDC 病変部位を採取し遺伝子発現変化を解析した (図11)。初期の PBC の CNSDC 病変部位ではインターフェロン- γ をはじめ活動性の高い炎症所見や免疫細胞の分化・増殖に関与する遺伝子の発現が強く認められた (表6)。したがって、初期病変ほど PBC に特徴的な遺伝子変化を示していると考えられる。一方、ウイルス性肝炎では病期の進行と共に免疫応答遺伝子の発現増強 (MHC の発現上昇など) が認められており、この点においても PBC の肝組織における遺伝子発現は他の肝炎における遺伝子発現と異なっている¹¹⁾。

5) cDNA イクローレイ法の代謝疾患解析への応用

昨今、生活習慣病と発癌との関連も注目されつつある。我々は、糖尿病病例における肝の遺伝子発現と正常肝の遺伝子発現を比較した。糖尿病の12名、糖尿病のない9名の肝臓における発現遺伝子解析の結果を示す (図12)。肝臓において発現している遺伝子のパターンから、症例は2群に大別され、これを分けているものは糖尿病があるか否かであった。すなわち糖尿病患者の肝臓において発現している遺伝子は、糖尿病のない人と大きく異なっていた。さらに詳細に検討すると、糖尿病の肝臓においては VEGF、エンドセリンといった血管新生に関わる遺伝子の発現が亢進しており、これが糖尿病の合併症である血管病変の進展に関与している可能性が示された¹²⁾。今後、肝臓の代謝疾患における役割も重要な課題と言える。

おわりに

肝疾患における網羅的遺伝子解析が各施設で進んでいる。昨今、ウイルス性肝炎以外の脂肪肝や NASH も生活習慣病との関連から注目されている。今後、肝細胞における本来の代謝、解毒、蛋白合成機能と、繊維化、炎症、発癌といった疾患の関連がさらに明らかになるものと考えられる。

- 1) Kawaguchi K, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Shirota Y, and Kobayashi K: Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method. *J Clin Microbiol* 41: 1701-4, 2003.
- 2) Kawai HF, Kaneko S, Honda M, Shirota Y, and Kobayashi K: alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. *Hepatology* 33: 676-91, 2001.
- 3) Kawaguchi K, Honda M, Yamashita T, and Kaneko S: Differential Gene Alteration among Hepatoma Cell Lines Demonstrated by cDNA Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005.
- 4) Iida H, Honda M, Kawai H, and Kaneko S: Ephrin-A1 Expression Contributes to the Malignant Characteristics of a Fetoprotein-Producing Hepatocellular Carcinoma. *Gut* 2005.
- 5) Honda M, Shimazaki T and Kaneko S: La Protein is a Potent Regulator of Replication of Hepatitis C Virus in Patients with Chronic Hepatitis C Through Internal Ribosomal Entry Site (IRES) Directed Translation. *Gastroenterology* 2005.
- 6) Yamashita T, Hashimoto S, Kaneko S, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, and Matsushima K: Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 110-6, 2000.
- 7) Yamashita T, Kaneko S, Hashimoto S, Sato T, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, and Matsushima K: Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 647-54, 2001.
- 8) Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Hoshino N, and Kaneko S: Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics* 84: 867-75, 2005.
- 9) Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y, and Kobayashi K: Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 120: 955-66, 2001.
- 10) Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, and Kobayashi K: Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 33: 832-40, 2001.
- 11) Honda M, Kawai H, Shirota Y, Yamashita T, and Kaneko S: Differential Gene Expression Profiles in Stage I Primary Biliary Cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology* 2005.
- 12) Takamura T, Sakurai M, Ota T, Ando H, Honda M, and Kaneko S: Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47: 638-47, 2004.